

Wpływ światła lasera na regenerację włókien mięśniowych u świń

MAREK PODBIELSKI, IWONA OTROCKA-DOMAGAŁA, TADEUSZ ROTKIEWICZ

Zespół Anatomii Patologicznej Katedry Patologii i Farmakologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn

Podbielski M., Otrocka-Domagała I., Rotkiewicz T.

Effects of laser light on regenerating muscle fibres in pigs

Summary

The aim of the study was to monitor the effects of radiation emitted by a low energy laser on regenerating the musculus longissimus lumborum in pigs. The muscle was damaged through injections of 10 cm³ of a 0.5% bupivacain solution. Analyses were carried out on 34 wbp gilts aged 10 weeks, with an average body weight of 20 kg. Infrared radiation was applied for 5 days at a wavelength of 830 nm emitted by a 100 mW laser with an energy density of 4 J/cm². The animals were euthanized 6, 12, and 24 hours as well as 2, 3, 4, 5, 7, 10 and 14 days after muscle damage. Muscle specimens were subjected to histopathology (HE, PAS acc. to McManus, HBFP, Feulgena, Unny), ultrastructure (TEM) and immunohistochemical analyses (PCNA, desmin, vimentin). Extensive blood extravasations were observed in the experimental pigs at the bupivacain injection site, which – after laser therapy – remained up to the second day, and in the control group – up to the fourth day of the experiment. Induced necrosis of muscle fibres was present up to day 14 in the control group and up to day 5 of the study in the experimental group. Numerous oval and fusiform, desmino positive and myoblasts were observed in the laser radiation-stimulated muscles as early as from day 2 of the experiment. Myoblasts were sporadic on day 2 in the control group, and it was observed that their number increased beginning from day 3. Myotubes and infrequent young fibres were observed in the experimental group as early as on day 3, and in the control group – on day 4. The results obtained indicate that bio-stimulation with laser light accelerates the regeneration process of necrosis muscle fibres due to more efficient phagocytosis of extravasated blood cells and necrosis of muscle fibres as well as the proliferation of myogenic cells. A substantially weaker effect of bio-stimulation was observed as far as the process of myoblast differentiation and growth of newly formed muscle fibres were concerned.

Keywords: muscle regeneration, laser therapy, pigs

Promieniowanie generowane przez lasery niskoenerygetyczne ma działanie biostymulacyjne na uszkodzone tkanki. Pod wpływem promieni lasera powstaje kaskada zmian w tkankach wywołana absorpcją fotonów przez układ oddechowy komórek (m.in. oksydację cytochromową, NAD), co przyspiesza reakcje utleniania i redukcji, a efektem tego jest wzrost zasobów energetycznych w komórkach. Pod wpływem naświetlania zwiększa się transport jonów Ca²⁺, potasu i sodu przez błonę komórkową, także wzrasta aktywność Na⁺/K⁺ ATP-azy. W komórkach wzrasta synteza białek oraz synteza DNA i RNA, co w dalszej kolejności powoduje proliferację komórek (15). Przyjmuje się, że promieniowanie w zakresie światła widzialnego ma korzystny wpływ na mitochondria i funkcjonowanie łańcucha oddechowego, a promieniowanie w zakresie podczerwieni wpływa stymulująco na błony komórkowe, zwiększając aktywną wymianę jonów (12). Pod wpływem naświetlania dochodzi do aktywacji układu dopełniacza (27), co powoduje m.in. wzrost przepusz-

czalności naczyń i pobudzenie fagocytozy przez granulocyty obojętnochłonne i monocyty. Ponadto korzystnie wpływa na mikrokrażenie i neoangiogenezę w uszkodzonych tkankach przez przyspieszenie proliferacji komórek śródbłonna naczyń (4) lub za pośrednictwem czynników wzrostu (m.in., TGFβ) (12).

Badania przeprowadzone na hodowlach komórek prekursorowych mięśni oraz izolowanych włóknach mięśniowych wykazały, że światło lasera pobudza aktywność i zwiększa gromadzenie się komórek satelitarnych w miejscach uszkodzenia włókien oraz proliferację mioblastów (2, 24-26), hamuje natomiast różnicowanie się komórek miogenicznych (2, 25). Pobudzenie komórek satelitarnych będących w fazie spoczynku i aktywności proliferacyjnej komórek miogenicznych następuje w wyniku aktywacji białkowych kinaz MAP/ERK (25). Kinazy pobudzają syntezę nukleotydów i białek, transkrypcję protoonkogenów, powodują rozluźnienie struktury chromatyny i stymulują translację (24). Dowiedziono również, że pro-

mieniowanie lasera chroni komórki miogeniczne przed apoptozą (26).

Do tej pory przeprowadzono nieliczne badania nad wpływem światła emitowanego przez urządzenia laserowe na regenerację mięśni u zwierząt. Doświadczenia takie wykonywano na szczurach (1, 30), ropuchach (4, 5) i świnkach morskich (8-11). W badaniach tych używano laseru helowo-neonowego (He-Ne), a uzyskane wyniki wskazywały na korzystny wpływ na regenerację uszkodzonego mięśnia szkieletowego. Stosowanie laserów He-Ne u świń jest nieuzasadnione, ze względu na niewielką głębokość przenikania wiązki promieni do naświetlanej tkanki. Dlatego celowe jest zastosowanie laserów półprzewodnikowych emitujących światło o długości fali 810, 830 i 904 nm, które przenika głęboko do tkanek.

Celem badań było prześledzenie procesu regeneracji mięśnia najdłuższego lędźwi *musculus longissimus lumborum* u świń w oparciu o metody histopatologiczne, ultrastrukturalne i immunohistochemiczne po wywołaniu eksperymentalnej martwicy włókien mięśniowych i zastosowaniu promieniowania emitowanego przez laser o niskiej mocy.

Materiał i metody

Doświadczenie przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej (decyzja nr 24/2006/N) na losowo wybranych 34 loszkach rasy wbp. w wieku 10 tygodni o średniej masie ciała 20 kg, które podzielono na dwie grupy. Loszki żywiono mieszanką pełnoporcjową PT-1, zgodnie z normami stosowanymi przy wychowie prosiąt po odsadzeniu. Paszę zadawano dwa razy dziennie. Zwierzęta miały stały dostęp do wody. Grupa I – kontrolna obejmowała 17 prosiąt, u których do mięśnia najdłuższego lędźwi (*m. longissimus lumborum*) wstrzyknięto po 10 cm³ 0,5% markainy (chlorek bupiwakainy) produkcji Astra. Iniekcji środka znieczulającego dokonywano po obu stronach kręgosłupa – po lewej stronie na wysokości 1-2 kręgu lędźwiowego oraz po stronie prawej na wysokości 4-5 kręgu lędźwiowego. Grupa II obejmowała również 17 prosiąt, którym wstrzyknięto podobnie jak w grupie I markainę i dodatkowo zastosowano naświetlanie promieniami podczerwonymi o długości fali 830 nm emitowane przez laser. Wykonano po 5 zabiegów przez 5 kolejne dni. Naświetlania wykonywano metodą kontaktową, wykorzystując do tego celu laser CTL-1106 MX produkcji Laser Instruments. Używany laser miał moc 100 mW, a gęstość energii, jaką zastosowano, wynosiła 4 J/cm². Każdorazowo naświetlano powierzchnię o średnicy 2,5 cm. Pole tej powierzchni wyliczono ze wzoru:

$$S = \frac{\pi \cdot d^2}{4} = 4,90 \text{ cm}^2$$

gdzie S – pole powierzchni, a d – średnica zmiany.

Na tej podstawie obliczono czas ekspozycji naświetlanych tkanek na światło lasera, wyznaczając uprzednio wielkość zastosowanej energii:

$$E = \zeta_E \cdot S = \frac{4 \text{ J} \cdot 4,90 \text{ cm}^2}{\text{cm}^2} = 19,60 \text{ J}$$

gdzie E – energia, ζ_E – gęstość energii, S – pole powierzchni,

$$t = \frac{E}{P} = \frac{19 \text{ 600 mJ}}{100 \text{ mW}} = 196 \text{ sek.} = 3 \text{ min. i } 16 \text{ sek.}$$

gdzie t – czas, E – energia, P – moc lasera.

Pierwsze naświetlanie wykonano po upływie 18 godzin od podania markainy, każde następne po upływie kolejnej doby.

Zwierzęta uśmiercano preparatem morbital po upływie 6, 12, i 24 godzin (po jednej sztuce) oraz po 2, 3, 4, 5, 7, 10 i 14 dniach (po dwie sztuki) po podaniu bupiwakainy. Bezpośrednio po śmierci pobierano wycinki mięśni do badania laboratoryjnego.

Badanie histopatologiczne. Pobrane wycinki mięśnia najdłuższego lędźwi utrwalano w buforowanej 10% formalinie, a następnie zatapiano w bloczki parafinowe. Uzyskane skrawki mikrotomowe z przekrojów podłużnych i poprzecznych mięśnia barwiono HE, metodą PAS wg McManusa, metodą HBFP (Haematoxylin-Basic Fuchsin Picric Acid) oraz metodami Unny i Feulgena (13) w celu oznaczania kwasów nukleinowych. W preparatach sporządzonych z mięśni zwierząt uśmierconych w 7., 10. i 14. dniu, dokonano pomiarów pola powierzchni włókien mięśniowych w obszarze regeneracji. Pomiarów dokonano przy użyciu zestawu do komputerowej analizy obrazu mikroskopowego, złożonego z kamery Panasonic CCD, mikroskopu Carl Zeiss Jena, karty akwizycji obrazu oraz programu komputerowego LUCIA 3,52.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono metodą analizy wariancji (test F) dla doświadczeń jedno- i dwuczynnikowych. Do badania istotności różnic średnich pól powierzchni badanych włókien mięśniowych zastosowano test q SNK (Studenta-Newmana-Keuls).

Badania ultrastrukturalne. W grupie I do badania mikroskopowo-elektronowego pobierano wycinki mięśni od świń uśmierconych po upływie 12 godzin oraz 4 i 7 dniach od podania markainy. W grupie II do badań pobierano wycinki od prosiąt uśmierconych po 4 i 7 dniach. Wycinki mięśni utrwalano w 2,5% paraformaldehydzie i 2% aldehydzie glutarowym w buforze fosforanowym o pH 7,4 oraz płukano w buforze przez 24 godziny. Następnie materiał powtórnie utrwalano 2% czterotlenkiem osmu w buforze fosforanowym o pH 7,4, odwadniano w ciągu alkoholi i acetonie, i zatapiano w Eponie 812. Uzyskane skrawki ultracienkie barwiono standardowo i przeglądano przy pomocy mikroskopu elektronowego typu TESLA BS 500.

Badanie immunohistochemiczne. W badaniach określano zachowanie się wimentyny, desminy i PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Do barwienia użyto przeciwciał monoklonalnych, mysich, przeznaczonych dla skrawków parafinowych. Przeciwciała anti-PCNA (DAKO) stosowano w rozcieńczeniu 1 : 150, zaś przeciwciała anty-desminowe (DAKO) i anty-wimentynowe (DAKO) stosowano w rozcieńczeniu 1 : 50. Zastosowane przeciwciała dla PCNA należały do klonu PC-10 (Ig G, kappa), zaś dla desminy i wimentyny były to klony D33 i V9 (Ig G₁ kappa). Po nawodnieniu preparatów przeznaczonych do oznaczania PCNA, umieszczano je w buforze cytrynianowym o pH 6,0, następnie w kuchence mikrofalowej gotowano dwa razy po 5 minut, przy mocy 650 W. Dalsze postępowanie było wspólne dla wszystkich badanych antygenów. Preparaty inkubowano w obecności H₂O₂ przez 15 minut,

płukano w PBS i dalej inkubowano przez 10 minut w 4% biotynylowanej surowicy bydlęcej. W dalszej kolejności nakładano na szkiełka przeciwciała monoklonalne, tj. przeciwko PCNA na 1 godzinę, a przeciwko wimentynie i desminie na 24 godziny. Barwienie wykonano metodą immunoperoksydazową z wykorzystaniem kompleksu extrawidyna-biotyna (metoda SAB). Wtórne przeciwciała kozie, biotynylowane anty-mysie (produkcji SIGMA), jak również kompleks extrawidyna-peroksydaza stosowano w roz-

cieńczeniu 1 : 20. Jako chromogenu użyto AEC (karbazol). Kontrolę negatywną wykonano z użyciem przeciwciał IgG₂ kappa i IgG₁ kappa, zaś kontrolę pozytywną przeprowadzono w skrawkach przygotowanych przez firmę DAKO.

Wyniki i omówienie

Mięśnie szkieletowe świń charakteryzują się wysoką wrażliwością na działanie czynników uszkodzających. Po domięśniowym wstrzyknięciu bupiwakainy

Tab. 1. Zmiany histopatologiczne po wstrzyknięciu bupiwakainy i stosowaniu laseroterapii

Rodzaj zmian	Dzień doświadczenia	Grupa I (kontrolna)	Grupa II (poddana laseroterapii)
Wynaczynienia krwi	2.	1 mięsień – rozległe 3 mięśnie – ograniczone	ograniczone we wszystkich mięśniach
	3.	1 mięsień – rozległe 2 mięśnie – ograniczone 1 mięsień – nieobecne	nieobecne we wszystkich mięśniach
	4.	ograniczone we wszystkich mięśniach	nieobecne we wszystkich mięśniach
Martwica włókien	4.	pojedyncze obumarłe włókna we wszystkich mięśniach	pojedyncze obumarłe włókna w połowie badanych mięśni
	5.	pojedyncze obumarłe włókna we wszystkich mięśniach	nie stwierdzono
	7.	pojedyncze obumarłe włókna w 3 mięśniach	nie stwierdzono
	10.	pojedyncze obumarłe włókna we wszystkich mięśniach	nie stwierdzono
	14.	pojedyncze obumarłe włókna we wszystkich mięśniach	nie stwierdzono
Naprawa – rozplem tkanki łącznej	10.	1 mięsień	nie stwierdzono
Nacieki fagocytów do miejsca uszkodzenia włókien	od 6 godzin do 5. dnia	liczne	liczne
	7.	obecne w 3 mięśniach	obecne w 2 mięśniach
	10.	nieliczne – obecne we wszystkich mięśniach	obecne w 1 mięśniu
	14.	nieliczne – obecne we wszystkich mięśniach	obecne w 2 mięśniach
Obecność mioblastów	2.	mioblasty owalne i nieliczne mioblasty wrzecionowate: mniej niż 50% PCNA-dodatnich	mioblasty owalne i liczne mioblasty wrzecionowate; przeważały PCNA-dodatnie
	3.	wrzecionowate; ok. 65% PCNA-dodatnie, w 1 mięśniu desmino-dodatnie	wrzecionowate desmino-dodatnie we wszystkich mięśniach; ponad 80% PCNA-dodatnie
	10.	w 2 mięśniach – pojedyncze w 2 mięśniach nie stwierdzono	nie stwierdzono
	14.	w 1 mięśniu – pojedyncze	nie stwierdzono
Obecność miotub	3.	nie stwierdzono	w 2 mięśniach – obecne nieliczne miotuby w 2 mięśniach nie stwierdzono
	5.	liczne we wszystkich mięśniach	liczne we wszystkich mięśniach
	7.	w 2 mięśniach – pojedyncze w 2 mięśniach – nie stwierdzono	w 2 mięśniach – pojedyncze w 2 mięśniach – nie stwierdzono
	10.	nie stwierdzono	w 1 mięśniu – pojedyncze
	14.	nie stwierdzono	nie stwierdzono
Obecność młodych włókien	4.	w 2 mięśniach – nieliczne w 2 mięśniach – nie stwierdzono	w 2 mięśniach – liczne w 2 mięśniach – pojedyncze
	5.	w 2 mięśniach – liczne w 2 mięśniach – pojedyncze	w 3 mięśniach – liczne w 1 mięśniu – pojedyncze
	10.	pojedyncze młode włókna we wszystkich mięśniach	w 1 mięśniu – liczne w 3 mięśniach – pojedyncze
		bardzo słaba reakcja na wimentynę w młodych włóknach	bardzo słaba lub brak reakcji na wimentynę w młodych włóknach
	14.	pojedyncze we wszystkich mięśniach	w 2 mięśniach – pojedyncze w 2 mięśniach tylko włókna dojrzałe

u świń wywołano martwicę skrzepową włókien mięśniowych. Podobne rezultaty uzyskali inni autorzy (3, 19, 21, 23). Szczegółowe zestawienie zmian mikroskopowych w miejscu wstrzyknięcia bupiwakainy w poszczególnych dniach doświadczenia przedstawiono w tab. 1.

Po sześciu godzinach od aplikacji bupiwakainy stwierdzono we włóknach mięśniowych zanik poprzecznego prążkowania, obecność węzłowych skurczy, ziarnisty lub grudkowy rozpad i wakuolizację włókien. Włókna wybarwiały się na kolor czerwony przy barwieniu metodą HBFP. Stwierdzono odcinki włókien wykazujących zwiększoną pyroninochłonność oraz większą ilość substancji PAS dodatnich. Martwica włókien mięśniowych u świń grupy kontrolnej była obecna do końca doświadczenia i obejmowała wówczas pojedyncze włókna, natomiast u zwierząt grupy II już od 5. dnia nie stwierdzono jej obecności. Uszkodzone włókna mięśniowe u świń ulegały regeneracji, a tylko u jednej, z grupy kontrolnej, stwierdzono naprawę uszkodzonego mięśnia przez rozplem tkanki łącznej włóknistej. Podobne wyniki po podaniu bupiwakainy uzyskali inni autorzy u różnych gatunków zwierząt (3, 16, 19, 21, 23), co wskazuje na dużą przydatność tego modelu doświadczalnego w badaniach nad regeneracją mięśni.

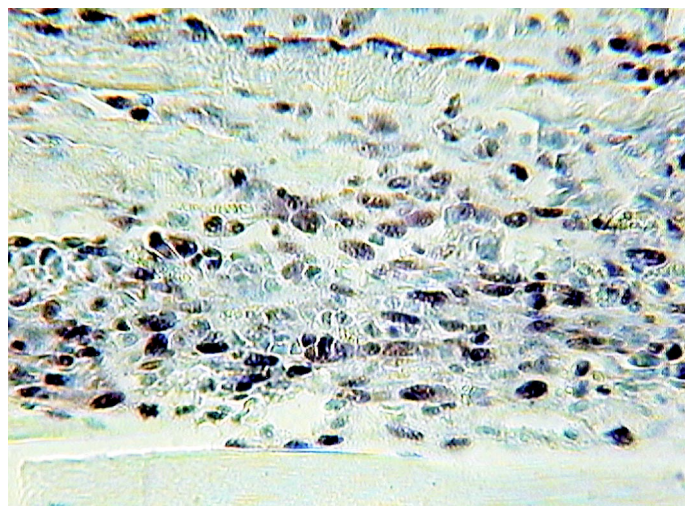
Po domięśniowej aplikacji bupiwakainy stwierdzono u świń wylewy krwawe o różnej rozległości (21). Wynaczynień krwi nie stwierdzano po podskórnym podaniu bupiwakainy w okolicę badanych mięśni, wykazując jedynie jej działanie miotoksyczne (3). Po 48 godzinach u świń grupy II stwierdzono znacznie mniejsze wynaczynienia krwi w tkance śródmięsniowej niż w grupie kontrolnej. Po 3 dniach w grupie II zaburzenia w krążeniu nie występowały, natomiast w grupie kontrolnej były obecne w 4. dniu doświadczenia. Podobne wyniki badań uzyskali Bibikova i wsp. (4), którzy ponadto wykazali w uszkodzonym mięśniu wcześniejszą i intensywniejszą rewaskularyzację.

Regeneracja uszkodzonych mięśni szkieletowych w dużym stopniu zależy od sprawnego usunięcia obumarłych włókien. U świń obu grup stwierdzono nacieki komórek fagocytarnych w mięśniach już po 6 godzinach od uszkodzenia. Wśród tych komórek były pojedyncze makrofagi i komórki polimorfonuklearne. Po 12 godzinach przeważały komórki polimorfonuklearne, a po 24 i 48 godzinach makrofagi, które wykazywały dużą pyroninochłonność. Po 3 dniach liczba komórek fagocytarnych w miejscu uszkodzenia mięśni u świń zmniejszała się, w grupie II spadek ten był większy. Podobne zmiany w składzie naciekających komórek w uszkodzonych mięśniowych stwierdzili inni autorzy (19, 20).

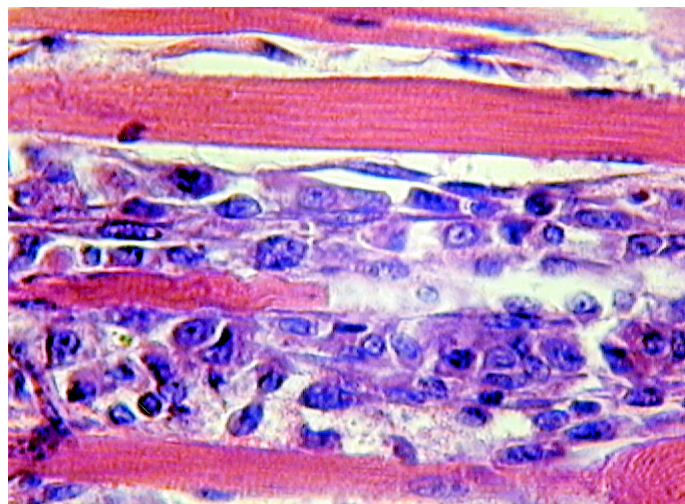
Wzrost ekspresji PCNA w komórkach prekursorowych mięśni stwierdzono u świń już po 6 godzinach po podaniu bupiwakainy. Po 24 godzinach ich liczba w miejscu uszkodzenia znacząco się zwiększyła, szczególnie w grupie II. U szczurów pobudzenie komórek

stwierdzono po 12 godzinach od uszkodzenia (17) lub 25 godzinach (23), co prawdopodobnie zależy od rodzaju uszkodzenia, typu uszkodzonego mięśnia, gatunku zwierząt i rasy (18). U badanych świń po 14 dniach stwierdzono także pojedyncze PCNA dodatnie komórki satelitarne wokół prawidłowych włókien mięśniowych.

W drugim dniu po uszkodzeniu mięśni u świń stwierdzano obecność mioblastów, których liczba wzrastała w kolejnych dniach. Ich aktywność proliferacyjna była znacznie większa u świń poddawanych laseroterapii. Tworzyły one rzędy dzielących się komórek ułożonych wzdłuż przetrwałych błon podstawnych po uprzątniętych włóknach (ryc. 1). Podobne wyniki uzyskano u szczurów, u których wrzecionowate mioblasty układały się wzdłuż sarkolemy włókien już po 24 godzinach od uszkodzenia (3, 16, 19). U świń po 48 godzinach od podania bupiwakainy stwierdzono liczne wrzecionowate mioblasty, które po 3 dniach ulegały fuzji, jednakże tylko w grupie II stwierdzono



Ryc. 1. Duża liczba mioblastów PCNA-dodatnich (wybarwiających się na brązowo) u świni z grupy II w 3. dniu po uszkodzeniu. Barw. met. SAB, pow. 240 ×



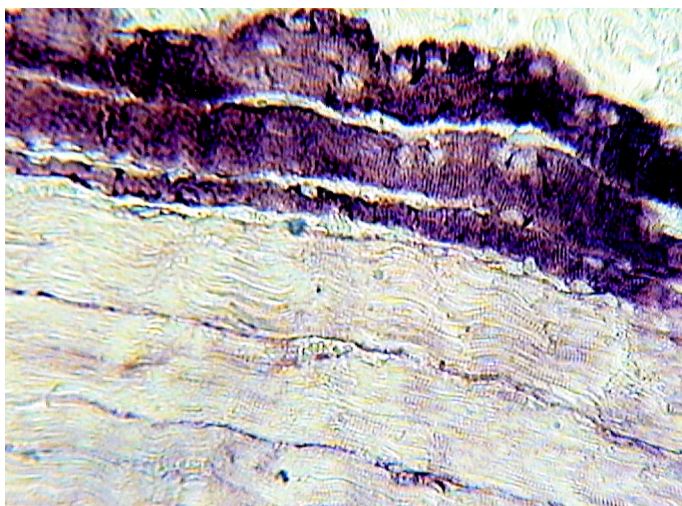
Ryc. 2. Liczne mioblasty wrzecionowate i tworzenie się miotub w 3. dniu po uszkodzeniu u świni z grupy II. Barw. HE, pow. 480 ×

obecność miotub (ryc. 2). Ich liczba wzrastała do 5. dnia doświadczenia. Badania wykonane na gryzoniach (16, 19, 23) również wykazały obecność miotub w mięśniach po 72 godzinach od wywołania martwicy. W jądrach miotub w czwartym dniu doświadczenia stwierdzono zanik ekspresji PCNA. W kolejnych dniach zmniejszała się liczba PCNA dodatnich mioblastów, komórek satelitarnych oraz komórek tkanki łącznej śródmięśniowej. Wyniki te znajdują potwierdzenie w badaniach innych autorów (19, 23).

W czwartym dniu u świń stwierdzono obecność młodych włókien, które liczniej występowały u świń grupy II. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (16, 21). Po 7 dniach w miejscu regeneracji przeważały młode włókna, o małej średnicy, z słabo zaznaczonym poprzecznym prążkowaniem i w różnym stopniu peryferyjnie położonymi jądrami. Po 14 dniach młode włókna miały budowę włókien dojrzałych.

Badaniem mikroskopowo-elektronowym potwierdzono fuzję mioblastów i powstawanie miotub oraz młodych włókien mięśniowych. Ponadto stwierdzono u świń filamenty kurczliwe w niektórych mioblastach i powstających miotubach, które układały się chaotycznie bądź jednokierunkowo wzdłuż długiej osi. Wyniki tych badań znajdują potwierdzenie w badaniach innych autorów (22).

Obecność w mioblastach wimentyny stwierdzono u świń po 2 dniach od uszkodzenia mięśni. Komórki te posiadały owalne jądra i układały się wzdłuż przetrwałej błony podstawnej włókien. Po 4 dniach reakcja na wimentynę była silna w mioblastach, a w komórkach ulegających fuzji była słaba. W miotubach a także w młodych włóknach reakcja na wimentynę była słaba lub śladowa. Rozmieszczenie wimentyny w komórkach i miotubach było równomierne. Jednocześnie wzrastała ekspresja desminy, co potwierdza pogląd o zastępowaniu wimentyny przez filamenty mięśniowo-specyficzne w dojrzewających włóknach (ryc. 3). Pogląd ten potwierdzają badania innych



Ryc. 3. Intensywna reakcja na obecność desminy w młodych włóknach mięśniowych u świni z grupy II w 7. dniu po uszkodzeniu. Barw. met. SAB, pow. 240 ×

Tab. 2. Analiza statystyczna powierzchni włókien mięśniowych (w μm^2) u świń w 7., 10. i 14. dniu doświadczenia

Dzień doświadczenia	Grupa I	Grupa II	Grupy łącznie
7.	341,33 ± 43,56 ^a	365,58 ± 20,41 ^A	352,14 ± 15,74 ^A
10.	404,59 ± 27,21 ^b	452,84 ± 25,17 ^B	418,12 ± 14,53 ^{AB}
14.	434,58 ± 25,21 ^c	526,28 ± 27,14 ^C	491,53 ± 18,95 ^B

Objaśnienia: a, b, c, A, B, C – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie – małymi przy $p \leq 0,05$, dużymi przy $p \leq 0,01$

autorów (28, 29), choć występują duże rozbieżności w określeniu czasu zastępowania wimentyny przez desminę (7, 14).

Analizując uzyskane wyniki pomiarów pola włókien mięśniowych stwierdzono brak istotnego wpływu laseroterapii na rozmiar średniego pola powierzchni włókien mięśniowych. Jedynie w 10. i 14. dniu można zaobserwować istotne różnice. Analizując wpływ czasu trwania doświadczenia na wielkość średniego pola powierzchni włókien stwierdzono, że nie ma on istotnego wpływu w grupie I, natomiast w grupie II miał istotny wpływ na wartość średniego pola powierzchni odtwarzanych włókien mięśniowych. Wykazano, że istotne różnice występują tylko między 7. i 14. dniem doświadczenia. Współdziałanie (interakcja) obu badanych czynników nie była istotna, co oznacza, że wraz z upływem czasu regeneracji mięśni obserwowano podobną tendencję wzrostu średniego pola powierzchni odnawiających się włókien mięśniowych (tab. 2).

Naświetlanie promieniami lasera spowodowało u świń przyspieszenie procesów odnowy uszkodzonych włókien mięśniowych. Przyspieszenie odnowy polegało na pobudzeniu fagocytowania i usuwaniu wynaczynionych krwinek i obumarłych włókien mięśniowych. Znacznie słabszy wpływ promieni lasera zaobserwowano na proces różnicowania się mioblastów i dojrzewanie nowo powstałych włókien, co potwierdza wyniki uzyskane w badaniach *in vivo* (2). Wydaje się, że istnieją ograniczone możliwości wywierania wpływu na przyspieszenie procesu regeneracji i dojrzewania odnawiających się włókien. Weiss i Oron (30) stwierdzili, że regeneracja postępuje szybciej w strefie sąsiadującej z nieuszkodzonymi włóknami, niż w centrum uszkodzenia. Taką samą zależność stwierdzono w badaniach własnych. Występowanie tego fenomenu nie do końca zostało wyjaśnione. Najprawdopodobniej spowodowane jest to uwalnianiem czynników chemotaktycznych oraz lepszym zaopatrzeniem tych obszarów przez naczynia w składniki odżywcze i tlen (6). Pogląd ten potwierdzają badania prowadzone *in vitro* z wykorzystaniem światła lasera na hodowlach komórek miogenicznych (2).

Wnioski

1. Zastosowanie naświetlania promieniami lasera uszkodzonych mięśni powoduje przyspieszenie fago-

cytozy obumarłych włókien, wzmacnia proliferację komórek miogenicznych i różnicowanie się mioblastów, w mniejszym stopniu wpływa na dynamikę dojrzewania nowo powstałych włókien mięśniowych.

2. Możliwości zwiększania tempa regeneracji w okresie formowania się i dojrzewania nowych włókien mięśniowych są ograniczone w dużo większym stopniu niż w okresie uprzątania martwiczych tkanek i proliferacji komórek miogenicznych.

Piśmiennictwo

1. Azarova V. S., Popova M. F., Iliasova S. G.: Effects of autotransplantation of minced muscle tissue and subsequent laser therapy on recovery of the muscle injured by irradiation. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* 1990, 110, 311-316.
2. Ben-Dov N., Shefer G., Irinichev A., Wernig A., Oron U., Halevy O.: Low-energy laser irradiation affects satellite cell proliferation and differentiation in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 148, 372-380.
3. Benoit P. W., Belt W. D.: Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anesthetic, bupivacaine (Marcain). *J. Anat.* 1970, 107, 547-556.
4. Bibikova A., Belkin V., Oron U.: Enhancement of angiogenesis in regenerating gastrocnemius muscle of the toad (*Bufo viridis*) by low-energy laser irradiation. *Anat. Embryol. Berl.* 1994, 190, 597-602.
5. Bibikova A., Oron U.: Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation. *Anat. Rec.* 1993, 235, 374-380.
6. Bischoff R.: Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibres in culture. *Dev. Biol.* 1986, 115, 129-139.
7. Bornemann A., Schmalbruch H.: Desmin and vimentin in regenerating muscles. *Muscle&Nerve* 1992, 15, 14-20.
8. Buliakova N. V., Telegina T. A., Iliasova S. G., Bekhoev I. D., Azarova V. S.: Effects of helium-neon laser on regeneration capacity of skeletal muscles of adult guinea pigs. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* 1992, 113, 411-414.
9. Buliakova N. V.: Effects of minced muscle tissue implantation and subsequent laser therapy on regeneration of skeletal muscles in guinea pigs. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* 1992, 114, 97-100.
10. Buliakova N. V., Azarova V. S.: A comparative study of the regenerative ability of skeletal muscles from adult rat and guinea pigs during laser therapy. *Dokl. Akad. Nauk* 1994, 337, 818-820.
11. Buliakova N. V.: Regenerative capacity of minced muscle tissue in newborn and adult guinea pigs. *J. Exp. Pathol.* 1992, 6, 115-121.
12. Calderhead R. G., Ohshiro T.: Progress in laser therapy. John Wiley&Sons, Chichester 1991.
13. Culling C. F. A.: Handbook of histopathological and histochemical techniques (Including museum techniques). Butterworths, London 1974.
14. Gard D. L., Lazarides E.: The synthesis and distribution of desmin and vimentin during myogenesis in vitro. *Cell* 1980, 19, 263-275.
15. Glinkowski W., Pokora L.: Lasery w terapii. Laser Instruments, Warszawa 1993.
16. Helliwell T. R.: Lectin binding and desmin staining during bupivacaine-induced necrosis and regeneration in rat skeletal muscle. *J. Pathol.* 1988, 155, 317-326.
17. Maltin C. A., Harris J. B., Cullen M. J.: Regeneration of mammalian skeletal muscle following the injection of the snake-venom toxin, taipoxin. *Cell. Tiss. Res.* 1983, 232, 565-577.
18. McGeachie J. K., Grounds M. D.: Initiation and duration of muscle precursor replication after mild and severe injury to skeletal muscle. *Cell. Tiss. Res.* 1987, 248, 125-130.
19. Ono K., Abe J. I., Kagawa N., Ii K., Hizawa K.: Immunohistochemical analysis of myoblast proliferation and differentiation in experimental skeletal muscle regeneration. *Zentralbl. Pathol.* 1993, 139, 231-237.
20. Orimo S., Hiyamuta E., Arahata K., Sugita H.: Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis. *Muscle&Nerve* 1991, 14, 515-520.
21. Otrocka-Domagala I.: Wpływ koenzymu Q10 i witaminy E na regenerację mięśni szkieletowych u świń. Praca dokt., Wydz. Med. Wet., UWM Olsztyn 2002.
22. Robertson T. A., Grounds M. D., Mitchell C. A., Papadimitriou J. M.: Fusion between myogenic cells in vivo: an ultrastructural study in regenerating murine skeletal muscle. *J. Struct. Biol.* 1990, 105, 170-182.
23. Saito Y., Nonaka I.: Initiation of satellite cell replication in bupivacaine-induced myonecrosis. *Acta Neuropathol. Berl.* 1994, 88, 252-257.
24. Shefer G., Barash I., Oron U., Halevy O.: Low-energy laser irradiation enhances de novo protein synthesis via its effects on translation-regulatory proteins in skeletal muscle myoblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 2003, 1593, 131-139.
25. Shefer G., Oron U., Irinichev A., Wering A., Halevy O.: Skeletal muscle cell activation by low-energy laser irradiation: a role for the MAPK/ERK pathway. *J. Cell. Physiol.* 2001, 187, 73-80.
26. Shefer G., Partridge T. A., Heslop L., Gross J. G., Oron U., Halevy O.: Low-energy laser irradiation promotes the survival and cell cycle entry of skeletal muscle satellite cells. *J. Cell. Sci.* 2002, 115, 1461-1469.
27. Śladowski D., Steer D., Willshaw A., Moore L., Clothier R., Balls M.: Complement photoactivation assay. *Toxicology in vitro* 1994, 8, 3-4.
28. Tokuyasu K. T., Maher P. A., Singer S. J.: Distributions of vimentin and desmin in developing chick myotubes in vivo. I. Immunofluorescence study. *J. Cell. Biol.* 1984, 98, 1961-1972.
29. Vater R., Cullen M. J., Harris J. B.: The expression of vimentin in satellite cells of regenerating skeletal muscle in vivo. *Histochem. J.* 1994, 26, 916-928.
30. Weiss N., Oron U.: Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation. *Anat. Embryol. Berl.* 1992, 186, 497-503.

Adres autora: dr Marek Podbielski, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn; e-mail: tadrot@uwm.edu.pl